




ENZYME CATALYSIS IN THE PRESENCE OF IONIC LIQUIDS

Patent number: WO0238784
Publication date: 2002-05-16
Inventor: KRAGL UDO (DE); KAFTZIK NICOLE (DE);
SCHOEFER SONJA (DE); WASSERSCHIED PETER (DE)
Applicant: SOLVENT INNOVATION GMBH (DE); KRAGL UDO (DE); KAFTZIK NICOLE (DE); SCHOEFER SONJA (DE); WASSERSCHIED PETER (DE)
Classification:
- **international:** C12P1/00; C12N9/00; C12P19/04; C12P19/12
- **european:** C12P1/00; C12P7/62; C12P19/26; C12P41/00C2
Application number: WO2001EP12869 20011107
Priority number(s): EP20000124195 20001108

Also published as:

 EP1205555 (A1)
 WO0238784 (A1)
 US2004096932 (A1)

Cited documents:

 EP0226563
 XP002163388
 XP002163389
 XP002163390
 XP002163391
more >>

Report a data error here

Abstract of **WO0238784**

The invention relates to the performance of enzyme-catalysed reactions in the presence of ionic liquids.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/38784 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation?: C12P 1/00, (74) Anwälte: WEBER, Thomas usw.; Patentanwälte, von
C12N 9/00, C12P 19/04, 19/12 Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Koeln
(DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12869
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. November 2001 (07.11.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
00124195.9 8. November 2000 (08.11.2000) EP
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SOLVENT INNOVATION GMBH [DE/DE];
Alarichstrasse 14 - 16, 50679 Koeln (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRAGL, Udo
[DE/DE]; Siebensternweg 17, 18198 Kritzmow (DE).
KRAFTZIK, Nicole [DE/DE]; Goethestrasse 6, 18055
Rostock (DE). SCHÖFER, Sonja [DE/DE]; Karlstrasse
12, 18055 Rostock (DE). WASSERSCHIED, Peter
[DE/DE]; Grevenbroicher Strasse 2, 50829 Koeln (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherch
- Zur Erklärung der Zweibuchsta
Abkürzungen wird auf die Erklär
Codes and Abbreviations") am A
der PCT-Gazette verwiesen.

Abstract



WO 02/38784 A1

(54) Title: ENZYME CATALYSIS IN THE PRESENCE OF IONIC LIQUIDS

(54) Bezeichnung: ENZYMKATALYSE IN GEGENWART IONISCHER FLÜSSIGKEITEN

(57) Abstract: The invention relates to the performance of enzyme-catalysed reactions in the presence of ionic liquids.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Durchführung Enzym-katalysierter Reaktionen in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten.

Enzymkatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Die Erfindung betrifft Zusammensetzungen umfassend ein Enzym sowie ionische Flüssigkeiten sowie ein Verfahren zur Durchführung Enzym-
5 katalysierter Reaktionen in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten.

Enzyme haben als Biokatalysatoren inzwischen einen festen Platz für Umsetzungen im Labor- und Industriemaßstab eingenommen. Dennoch treten trotz aller Erfolge bei enzymatischen Reaktionen immer noch Probleme auf wie
10 beispielsweise

- niedrige Produktivitäten aufgrund zu geringer Eduktlöslichkeiten;
- niedrige Ausbeuten bei Gleichgewichtsreaktionen;
- unzureichende Selektivität bei regio- oder stereoselektiven Umsetzungen;
- Produktinhibierung;
- 15 - Auftreten von Nebenreaktionen (Parallel-, Folgereaktionen).

Bekannt sind Ansätze, diese Probleme durch Zusatz organischer Lösungsmittel (G. Carrea, S. Riva, Angew. Chem. 2000, 112, 2312; J. M. S. Cabral, M. R. Aires-Barros, H. Pinheiro, D. M. F. Prazeres, J. Biotechnol. 1997, 59, 133; M. N. Gupta, Eur. J. Biochem. 1992, 203, 25), Zusatz von Salzen (A. M.
20 Blinkorsky, Y. L. Khmelnitzky, J. S. Dordick, J. Am. Chem. Soc. 1999, 116, 2697) oder durch Durchführung der Reaktion in Mikroemulsionen (B. Orlich, R. Schomäcker 1999, 65, 357-362) zu lösen. Oft sind die dadurch erzielten Verbesserungen jedoch nicht signifikant und rechtfertigen nicht den zusätzlichen Aufwand, oder die Enzymstabilität nimmt unter diesen
25 Bedingungen stark ab (G. Carrea, S. Riva, Angew. Chem. 2000, 112, 2312).

Ionische Flüssigkeiten sind bei niedrigen Temperaturen (<100 °C) schmelzende Salze, die eine neuartige Klasse von Lösungsmitteln mit nicht-molekularem, ionischem Charakter darstellen. Auch wenn erste Vertreter bereits seit 1914 bekannt sind, werden ionische Flüssigkeiten erst in den
30 letzten 15 Jahren intensiv als Lösungsmittel für chemische Umsetzungen untersucht. Ionische Flüssigkeiten besitzen keinen messbaren Dampfdruck. Dies ist aus verfahrenstechnischer Hinsicht ein großer Vorteil, da auf diese Weise die destillative Trennung eines Reaktionsgemisches als effektive

Methode zur Produktabtrennung möglich ist. Die bekannten Probleme durch Azeotropbildung zwischen Lösungsmitteln und Produkten treten nicht auf. Ionische Flüssigkeiten sind bis über 200 °C temperaturstabil. Durch geeignete Wahl von Kation und Anion ist eine stufenweise Einstellung der Polarität und damit eine Abstimmung der Löslichkeitseigenschaften möglich. Die Bandbreite reicht dabei von wassermischbaren ionische Flüssigkeiten über wassernichtmischbare bis hin zu solchen, die selbst mit organischen Lösungsmitteln zwei Phasen bilden. Die geschickte Ausnutzung der außerordentlichen Löslichkeitseigenschaften ist der Schlüssel zum erfolgreichen Einsatz der ionische Flüssigkeiten als neuartige Lösungsmittelklasse.

Ionische Flüssigkeiten konnten als neuartige Medien in der Zweiphasen-Katalyse oder als Medium zur flüssig-flüssig-Extraktion bereits erfolgreich eingesetzt werden (P. Wasserscheid, W. Keim, Angew. Chem. **2000**, *112*, 3926).

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß bei der Umsetzung verschiedenster Edukte mit unterschiedlichen Enzymen in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten eine starke Erhöhung der Ausbeute und Selektivität festgestellt, die gegenüber dem bekannten Stand der Technik eine deutliche Verbesserung darstellt. Nachteilige Auswirkungen der ionischen Flüssigkeit auf die Enzymstabilität wurden nicht festgestellt, im Einzelfall wurde sogar eine stabilisierende Wirkung gefunden.

Dies ist unerwartet und überraschend, berücksichtigt man die ionische Natur der ionischen Flüssigkeiten und die damit möglichen starken Wechselwirkungen zwischen der ionischen Flüssigkeit und dem Enzym mit seinen ebenfalls geladenen Gruppen.

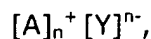
Ebenso wurde gefunden, dass ionische Flüssigkeiten als Co-Solventien zur Verbesserung der Löslichkeit von Edukten und Produkten eingesetzt werden können.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Umsetzung von Substanzen (Edukten) in Gegenwart von Enzymen als Katalysator in einem Reaktionsmedium umfassend ionische Flüssigkeiten.

Die ionische Flüssigkeit kann dabei mit Wasser mischbar oder mit Wasser nicht mischbar sein. Ebenso ist eine ein-, zwei- oder mehrphasige Reaktionsführung möglich.

Bei den ionischen Flüssigkeiten handelt es sich um Verbindungen der

5 allgemeinen Formel



wobei

10 $n = 1$ oder 2 ist und

das Anion $[Y]^{n-}$ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

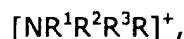
Tetrafluoroborat ($[BF_4]^-$), Tetrachloroborat ($[BCl_4]^-$), Hexafluorophosphat ($[PF_6]^-$), Hexafluoroantimonat ($[SbF_6]^-$), Hexafluoroarsenat ($[AsF_6]^-$),

15 Tetrachloroaluminat ($[AlCl_4]^-$), Trichlorozinkat ($[ZnCl_3]^-$), Dichlorocuprat, Sulfat ($[SO_4]^{2-}$), Carbonat ($[CO_3]^{2-}$), Fluorosulfonat, $[R'-COO]^-$, $[R'-SO_3]^-$ oder $[(R'-SO_2)_2N]^-$, und R' ein linearer oder verzweigter 1 bis 12

Kohlenstoffatome enthaltender aliphatischer oder alicyclischer Alkyl- oder ein C_5 - C_{18} -Aryl-, C_5 - C_{18} -Aryl- C_1 - C_6 -alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkyl- C_5 - C_{18} -aryl-Rest ist, der durch Halogenatome substituiert sein kann,

20 das Kation $[A]^+$ ist ausgewählt aus

- quarternären Ammonium-Kationen der allgemeinen Formel



25 - Phosphonium-Kationen der allgemeinen Formel



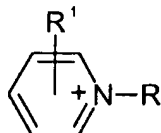
- Imidazolium-Kationen der allgemeinen Formel

30

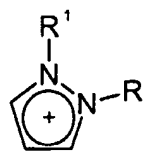


wobei der Imidazol-Kern substituiert sein kann mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

- 5 - Pyridinium-Kationen der allgemeinen Formel

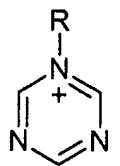


- 10 wobei der Pyridin-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,
- Pyrazolium-Kationen der allgemeinen Formel



- 15 wobei der Pyrazol-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,
- und Triazolium-Kationen der allgemeinen Formel

20



- 25 wobei der Triazol-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

und die Reste R^1 , R^2 , R^3 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- Wasserstoff;

5 - linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Alkylgruppen mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen;

- Heteroaryl-, Heteroaryl- C_1 - C_6 -Alkylgruppen mit 3 bis 8

Kohlenstoffatomen im Heteroaryl-Rest und wenigstens einem Heteroatom ausgewählt aus N, O und S, der mit wenigstens einer Gruppe ausgewählt aus C_1 - C_6 -Alkylgruppen und/oder Halogenatomen substituiert sein

10 können;

- Aryl-, Aryl- C_1 - C_6 -Alkylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls mit wenigstens einer C_1 - C_6 -Alkylgruppen und/oder einem Halogenatomen substituiert sein können.

15 In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine Zusammensetzung umfassend ein Enzym sowie wenigstens eine der oben definierten ionischen Flüssigkeit. Diese Zusammensetzungen können als Ausgangspunkt für die Durchführung der oben genannten enzymatisch katalysierten Reaktionen dienen. Dementsprechend können die erfindungsgemäßen

20 Zusammensetzungen neben dem Enzym (Biokatalysator) auch die umzusetzenden Edukte (Substrate) enthalten und, bei Voranschreiten der Reaktion, selbstverständlich auch die durch die enzymatische Reaktion erhältlichen Reaktionsprodukte.

Ein noch weiterer Aspekt ist somit die Verwendung von ionischen

25 Flüssigkeiten, insbesondere der oben definierten ionischen Flüssigkeiten, als Reaktionsmedium oder Bestandteil des Reaktionsmediums in der Biokatalyse, also der Durchführung von enzymatisch katalysierten Reaktionen an Substraten.

In einer besonderen Ausgestaltung der Erfindung können die Alkyl-, Aryl-,

30 Arylalkyl- und Alkylaryl-Sulfonatgruppen (Anion [Y]) durch Halogenatome, insbesondere Fluor, Chlor oder Brom substituiert sein. Besonders bevorzugt sind die fluorierten, insbesondere die perfluorierten Alkyl- und obengenannten Arylsulfonate, wie das Trifluormethansulfonat (Triflat). Als nicht halogenierte

Vertreter sind die Methansulfonat-, Benzolsulfonat- und die Toluolsulfonat-Gruppe zu nennen, sowie alle weiteren im Stand der Technik bekannten Sulfonat-Austrittsgruppen.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung können die Alkyl-, Aryl-,
5 Arylalkyl- und Alkylaryl-Carboxylatgruppen durch Halogenatome, insbesondere Fluor, Chlor oder Brom substituiert sein. Besonders bevorzugt sind die fluorierten, insbesondere die perfluorierten Alkyl- und obengenannten Arylcarboxylate, wie das Trifluormethancarboxylat (Trifluoracetat; CF_3COO^-). Als nicht halogenierte Vertreter sind die Acetat- und Benzoat-Gruppe zu
10 nennen, sowie alle weiteren im Stand der Technik bekannten Carboxylat-Austrittsgruppen.

In bevorzugten Ausgestaltungen der Erfindung können die im Zusammenhang mit den Substituenten erwähnten C_1 - C_6 -Alkyl-Gruppen jeweils unabhängig voneinander durch C_2 - C_4 -Alkyl-Gruppen ersetzt werden. Ebenso können die im
15 Zusammenhang mit den Substituenten erwähnten C_1 - C_6 -Alkoxy-Gruppen jeweils unabhängig voneinander durch C_2 - C_4 -Alkoxy-Gruppen ersetzt werden. In einer weiteren Alternative der Erfindung können die im Zusammenhang mit den Substituenten erwähnten C_5 - C_{12} -Aryl-Gruppen jeweils unabhängig voneinander durch C_6 - C_{10} -Aryl-Gruppen, die C_3 - C_8 -Heteroaryl-Gruppen jeweils
20 unabhängig voneinander durch C_3 - C_6 -Heteroaryl-Gruppen ersetzt werden. Die Halogenatome, mit welchen die Alkyl-, Alkoxy- und Aryl-Gruppen substituiert sein können sind ausgewählt aus Fluor, Chlor, Brom und Iod, vorzugsweise Fluor, Chlor und Brom.

Ein einer bevorzugten Ausgestaltung ist der Rest R' ein linearer oder
25 verzweigter 1 bis 8 Kohlenstoffatome enthaltender aliphatischer oder alicyclischer Alkyl- oder ein C_6 - C_{10} -Aryl-, C_6 - C_{10} -Aryl- C_1 - C_4 -alkyl- oder C_1 - C_4 -Alkyl- C_6 - C_{10} -Arylrest, der durch Halogenatome substituiert sein kann.

Die Kationen [A] sind beispielsweise ausgewählt aus Trimethylphenylammonium, Methyltrioctylammonium, Tetrabutyl-
30 phosphonium, 3-Butyl-1-methyl-imidazolium, 3-Ethyl-1-methyl-imidazolium, N-Butylpyridinium, N-Ethylpyridinium, Diethylpyrazolium, 1-Ethyl-3-methylimidazolium, 1-Butyl-3-methylimidazolium, 1-Hexyl-3-methylimidazolium, 1-Octyl-3-methylimidazolium, 1-Decyl-3-

methylimidazolium, 1-Butyl-4-methylpyridinium, 1-Butyl-3-methylpyridinium, 1-Butyl-2-methylpyridinium, 1-Butyl-pyridinium, Butyl-Methyl-Imidazolium, Nonyl-Methyl-Imidazolium, Butyl-Methyl-Imidazolium, Hexyl-Methyl-Imidazolium, Octyl-Methyl-Imidazolium, 4-Methyl-Butyl-Pyridinium, 5 Triethylammonium, Triethylmethylammonium, Butylmethyl-Pyridinium, Propylammonium, Methyl-Methyl-Imidazolium, Ethyl-Methyl-Imidazolium, Butyl-Methyl-Imidazolium und Butyl-Methyl-Imidazolium.

Ionische Flüssigkeiten sowie deren Herstellung sind im Stand der Technik bekannt. Zur Synthese von ionischen Flüssigkeiten mit Hexafluorophosphat-, 10 Tetrafluoroborat-, Bis(trifluormethylsulfonyl)amid-, Perfluoralkylsulfonat- und Perfluoralkylcarboxylat-Ionen wird zunächst durch Reaktion eines Amins $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$, eines Phosphans $\text{PR}^1\text{R}^2\text{R}^3$, eines Imidazolderivates der allgemeinen Formel $\text{R}^1\text{R}^2\text{N}=\text{CR}^3\text{-R}^5\text{-R}^3\text{C}=\text{N}^+\text{R}^1\text{R}^2$ oder eines Pyridiniumderivates der allgemeinen Formel $\text{R}^1\text{R}^2\text{N}=\text{CR}^3\text{R}^{4+}$ mit einem Alkylchlorid, Alkylbromid oder 15 Alkyljodid das entsprechende Halogenidsalz $[\text{Kation}]^+\text{X}^-$ gebildet und isoliert (F.H. Hurley, T.P. Wier, Jr., J. Electrochem. Soc. 1951, 98, 207-212; J.S. Wilkes, J.A. Levisky, R.A. Wilson, C.L. Hussey, Inorg. Chem. 1982, 21, 1263-1264; A.A.K. Abdul-Sada, P.W. Ambler, P.K.G. Hodgson, K.R. Seddon, N.J. Steward, WO-A-95/21871) R.H. Dubois, M.J. Zaworotko, P.S. White, Inorg. 20 Chem. 1989, 28, 2019-2020; J.F. Knifton, J. Mol. Catal. 1987, 43, 65-78; C.P.M. Lacroix, F.H.M. Dekker, A.G. Talma, J.W.F. Seetz, EP-A-0989134). Ausgehend vom gebildeten und isolierten Halogenidsalz $[\text{A}]^+\text{X}^-$ sind zwei unterschiedliche Wege zur Synthese von ionischen Flüssigkeiten mit Hexafluorophosphat-, Tetrafluoroborat-, Bis(trifluormethylsulfonyl)-amid-, 25 Perfluoralkylsulfonat- und Perfluoralkylcarboxylat-Ionen bekannt. Zum einen wird das Halogenidsalz durch Zugabe eines Metallsalzes MY (unter Ausfällung oder Abscheidung des Salzes MX oder des Produktes $[\text{A}]^+[\text{Y}]^-$ aus dem jeweils verwendeten Lösungsmittel) umgesetzt - wobei $[\text{Y}]^-$ ein Hexafluorophosphat-, Tetrafluoroborat-, Bis(trifluormethylsulfonyl)amid-, Perfluoralkylsulfonat- und 30 Perfluoralkylcarboxylat-Ion darstellt und M^+ für ein Alkalikation steht (J.S. Wilkes, M.J. Zaworotko, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1992, 965-967; Y. Chauvin, L. Mußmann, H. Olivier, Angew. Chem. 1995, 107, 2941-2943; P.A.Z. Suarez, J.E.L. Dullius, S. Einloft, R.F. de Souza, J. Dupont, Polyhedron, 1996,

15, 1217-1219; P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Inorg. Chem. 1996, 35, 1168-1178; C.M. Gordon, J.D. Holbrey, A.R. Kennedy, K.R. Seddon, J. Mater. Chem. 1998, 8, 2627-2638; P.A.Z. Suarez, S. Einloft, J.E.L. Dullius, R.F. de Souza, J. Dupont, J. Chim. Phys. 5 1998, 95, 1626-1639; A.J. Carmichael, C. Hardacre, J.D. Holbrey, M. Nieuwenhuyzen, K.R. Seddon, Anal. Chem. 1999, 71, 4572-4574; J.D. Holbrey, K.R. Seddon, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1999, 2133-2140). Zum anderen wird durch Zugabe einer starken Säure H^+ $[Y]^-$ das Halogenidion unter Freisetzung von H^+ X^- verdrängt und gegen $[Y]^-$ ausgetauscht - wobei $[Y]^-$ hier 10 für ein Hexafluorophosphat-, Tetrafluorborat-, Bis(trifluormethylsulfonyl)amid-, Perfluoralkylsulfonat- und Perfluoralkylcarboxylat-Ion steht (J. Fuller, R.T. Carlin, H.C. de Long, D. Haworth, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994, 299-300). Besonders vorteilhaft jedoch können ionische Flüssigkeiten nach dem in der EP 15 00118441.5 beschriebenen Verfahren halogenidfrei hergestellt werden.

In einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die ionische Flüssigkeit als alleiniges Reaktionsmedium, also frei von weiteren Lösungsmitteln eingesetzt. Der Anteil der ionischen Flüssigkeit im Reaktionsmedium kann aber auch zwischen 0,1 bis 99,9 Volumenprozent 20 betragen, vorzugsweise zwischen 5 und 75 Volumenprozent, noch bevorzugter zwischen 15 oder 50 und 75 Volumenprozent, bezogen auf die Gesamtmenge des Reaktionsmediums.

Das Reaktionsmedium kann zusätzlich zu der ionischen Flüssigkeit noch ein weiteres Lösungsmittel enthalten. Dieses kann ausgewählt sein aus der 25 Gruppe bestehend aus Wasser, Puffer-Lösungen (pH 2 bis 10, vorzugsweise 5 bis 8) und organischen Lösungsmitteln. Einsetzbare organische Lösungsmittel sind mit Wasser mischbar oder nicht mit Wasser mischbar. Beispielhaft seien als organische Lösungsmittel Methyl-tert.-butylether, Toluol, Hexan, Heptan, tert.-Butanol, Glycole, Polyalkylenglycole genannt. Im übrigen kommen aber 30 grundsätzlich alle herkömmlichen, auf dem Gebiet der Enzymkatalyse bekannten Lösungsmittel in Frage.

Als Enzyme kommen grundsätzlich alle Enzyme der EC-Klassen 1 bis 6 in Frage. Die Klassifizierung von Enzymen wird vom "Nomenclature Committee of

the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUBMB) empfohlen. Das Enzym liegt entweder homogen gelöst vor, kann aber ebenso als Suspension oder als Immobilisat auf einem inerten Träger eingesetzt werden.

- 5 Erfindungsgemäß wurde gefunden, dass die Gegenwart ionischer Flüssigkeiten im Reaktionsmedium bei enzymatisch katalysierten Reaktionen zu einer Verbesserung der Substratlöslichkeit (Biokompatibilität), zu einer Verbesserung der Enzymaktivität, zu einer Verbesserung der Selektivität, zu einer Verringerung von Produktinhibierung, zur Unterdrückung von
- 10 Nebenreaktionen (Parallel-, Folgereaktionen) und/oder zu einer Erhöhung der Enzymstabilität führt. Die Beispiele belegen, dass Enzyme aus unterschiedlichen Klassen eingesetzt werden können, wobei der Einsatz ionischer Flüssigkeiten signifikante Vorteile bietet, wie beispielsweise eine Erhöhung der Aktivität bei der Formiat-Dehydrogenase, eine deutliche Erhöhung
- 15 der Ausbeute bei Reaktionen mit der Galactosidase, eine Erhöhung der Enantioselektivität bei Lipasen und eine Verbesserung der Eduktlöslichkeit bei hydrophoben Edukten.

- Erfindungsgemäß kann das Enzym zusammen mit der Gesamtmenge der ionischen Flüssigkeit oder einem Teil davon mehrfach oder in kontinuierlich
- 20 betriebenen Reaktoren eingesetzt werden.

- Die Enzyme können ausgewählt sein aus der Klasse der Oxidoreduktasen zur regio- und stereoselektiven Oxidation und Reduktion, aus der Klasse der Glycosidasen zur Synthese von Oligosacchariden, aus der Klasse der Lipasen zur Gewinnung optisch aktiver Produkte (u. a. Alkohole, Amine, Carbonsäuren)
- 25 aus der Klasse der Lyasen zur Synthese und Hydrolasen.

- Das erfindungsgemäße Verfahren kann bei Temperaturen von -10 °C bis 130 °C, vorzugsweise in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 80 °C, besonders bevorzugt in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C durchgeführt werden.

- 30 Das Verfahren kann in einphasiger Weise oder in einem mehrphasigen Reaktionssystem durchgeführt werden.

Im Nachfolgenden sollen einige Effekte, die durch die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Reaktionsmedium oder als Bestandteil von

Reaktionsmedien für enzymatische Reaktionen beispielhaft erläutert werden. So werden für die enzymatische Reduktion von Ketonen unter anderem Alkoholdehydrogenasen aus verschiedenen Quellen eingesetzt. Die Löslichkeit von hydrophoben Ketonen kann durch Zusatz organischer Lösungsmittel verbessert werden; dies führt jedoch in der Regel zu einer Verringerung der Enzymaktivität und Stabilität (W. Hummel, Biochem. Eng. Biotechnol. 1997, 58, 145; A. Liese, T. Zelinski, M.-R. Kula, H. Kierkels, M. Karutz, U. Kragl, C. Wandrey, J. Mol. Cat. B 1998, 4, 91). In analoger Weise können wassermischbare ionische Flüssigkeiten zur Erhöhung der Eduktlöslichkeit dem Reaktionsmedium hinzugefügt werden. Für die Formiatdehydrogenase, die zur Cofaktorregenerierung eingesetzt wird, wird im gleichen Konzentrationsbereich der ionischen Flüssigkeit eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zum rein wässrigen System beobachtet (vgl. Beispiel 1) Eine Desaktivierung des Enzyms auch bei längerer Einwirkzeit der ionischen Flüssigkeit wurde nicht beobachtet. Somit bieten ionische Flüssigkeiten eine wertvolle Möglichkeit, die Produktivität enzymatischer Reaktionen durch einen Anstieg der Eduktkonzentration zu erhöhen. Dies ist besonders interessant für schlecht bis sehr schlecht lösliche Edukte wie etwa aromatische Ketone oder Steroide.

Seit etwa 20 Jahren werden Glycosidasen nicht nur für die Spaltung von Bindungen zwischen Sacchariden benutzt, sondern auch für die Synthese von Di- und Oligosacchariden. Trotz vieler Versuche, durch in der Regel teure Aktivierung der Edukte, Einsatz von wassermischbaren Lösungsmitteln (führt zu verringerter Enzymstabilität) sind selbst in neuesten Arbeiten Ausbeuten bis zu maximal 31% erreicht worden (J. H. Yoon, J. S. Rhee, Carbohydr. Res. 2000, 327, 377; M. J. Hernaiz, D. H. G. Crout, J. Mol. Cat. B 2000, 10, 403) Bei diesen Reaktionen ist das Hauptproblem die sofort einsetzende Sekundärhydrolyse des Produktes, katalysiert durch das gleiche Enzym. Überraschenderweise wird diese Sekundärhydrolyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten bei sonst gleicher Aktivität des Enzyms fast vollständig unterdrückt. Für das Beispiel der β -Galactosidase-katalysierten Synthese von *N*-Acetyllactosamin, einem wichtigen Baustein für pharmakologisch relevante Oligosaccharide, konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart ionischer

Flüssigkeiten die Ausbeute bei Verwendung von Lactose als preiswertem Donor auf über 55% steigert! Ohne Zusatz ionischer Flüssigkeiten werden maximal 30% erreicht; allerdings nimmt die Produktkonzentration durch die Sekundärhydrolyse rasch auf Werte <10% ab. Da in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten die Sekundärhydrolyse des Produktes unterbleibt, ergibt sich eine vereinfachte Reaktionsführung, da es nicht notwendig ist, die Reaktion zu verfolgen und beim Maximum der Produktausbeute abubrechen. Die Galactosidase ist in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten sehr stabil und kann nach Abtrennung mittels Ultrafiltration wiederholt eingesetzt werden, ohne dass sich die erzielbare Ausbeute und die Produktbildungsgeschwindigkeit verändert.

Vorteile bieten ionische Flüssigkeiten auch bei der Revershydrolyse zur Synthese von Di- und Oligosacchariden. Hierbei werden in der Regel hohe Eduktkonzentrationen zusammen mit Zusätzen – meist organischen Lösungsmitteln – zur Verringerung der Wasseraktivität verwendet. Ionische Flüssigkeiten bieten hier insbesondere den Vorteil des sehr guten Lösungsvermögens für Kohlenhydrate. Bei der enzymatischen Synthese von Lactose konnte gegenüber der Literatur die Ausbeute um den Faktor 2 gesteigert werden sowie die Reaktionszeit um den Faktor 5 gesenkt werden (K. Ajisaka, H. Fujimoto, H. Nishida, Carbohydr. Res. 180, 35-42 (1988))

Der Einsatz von Lipasen in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln in ein- oder zweiphasiger Reaktionsführung ist Stand der Technik (G. Carrea, S. Riva, Angew. Chem. 2000, 112, 2312, U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and stereoselective biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, 1999; A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, Industrial Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, 2000; M. C. Parker, S. A. Brown, L. Robertson, N. J. Turner, Chem. Commun. 1998, 2247). Allerdings wurde bisher in konventioneller Weise das Enzym durch Filtration abgetrennt und die Reaktionslösung konventionell durch Destillation aufgetrennt und das Lösungsmittel zurückgeführt. Der Einsatz ionischer Flüssigkeiten gestattet die direkte destillative Abtrennung der Reaktanden aus der Reaktionsmischung selbst in Gegenwart des Enzyms, so dass sich eine

vereinfachte Verfahrensweise ergibt. Diese Verfahrensweise ist, wenn die Reaktanden entsprechende Flüchtigkeit besitzen, nicht auf Lipasen beschränkt. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Lipasen für die Racematspaltung in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten wurde überraschenderweise in mehreren

5 Fällen festgestellt, dass sich die Umsatzgeschwindigkeit und die Enantioselektivität zum Teil deutlich verbessert, im Einzelfall um den Faktor 5 besser. Als Vergleich dient die Reaktion in *tert.*-Butylmethylether, der auch in industriellen Prozessen als Lösungsmittel für Lipase-katalysierte Reaktionen eingesetzt wird.

- 10 Die Ergebnisse zeigen, dass ionische Flüssigkeiten als Reaktionsmedium für enzymatische Umsetzungen zahlreiche Vorteile gegenüber den Bedingungen, die als Stand der Technik etabliert sind, bieten und als biokompatible Lösungsmittel genutzt werden können, um Umsetzungen gezielt zu beeinflussen.

15

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher beschrieben ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Beispiele:

20

Zur Beschreibung von in den Beispielen verwendeten Komponenten wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

	<i>tert.</i> -Butylmethylether	tBME,	MTBE
25	Butyl-Methyl-Imidazolium PF ₆ ⁻	BMI ⁺	PF ₆ ⁻
	Nonyl-Methyl-Imidazolium PF ₆ ⁻	NMI ⁺	PF ₆ ⁻
	Butyl-Methyl-Imidazolium BF ₄ ⁻	BMI ⁺	BF ₄ ⁻
	Hexyl-Methyl-Imidazolium BF ₄ ⁻	HMI ⁺	BF ₄ ⁻
	Octyl-Methyl-Imidazolium BF ₄ ⁻	OMI ⁺	BF ₄ ⁻
30	4-Methyl-Butyl-Pyridinium BF ₄ ⁻	4-MBP ⁺	BF ₄ ⁻
	Triethylammonium-Methylsulfat	Et ₃ NH ⁺	MeSO ₄ ⁻
	Triethylmethylammonium-Methylsulfat	Et ₃ NMe ⁺	MeSO ₄ ⁻

	Butylmethyl-Pyridinium BF_4^-	BMPy ⁺	
	BF_4^-		
	Propylammonium-Nitrat	PrNH ₃ ⁺	NO_3^-
	Methyl-Methyl-Imidazolium-Methylsulfat	MMIm ⁺	MeSO_4^-
5	Ethyl-Methyl-Imidazolium-Benzoat	EMIm ⁺	PhCO_2^-
	Butyl-Methyl-Imidazolium-Trifluormethansulfonat	BMIm ⁺	CF_3SO_3^-
			(= Triflat)
	Bis-(Trifluormethyl	Butyl-Methyl-Imidazolium-	
10	sulfonyl)-imidat	BMIm ⁺ (CF_3SO_2) ₂ N ⁻	

1. Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH)

Als Testreaktion zur Bestimmung der Enzymaktivität dient die FDH-katalysierte
 15 Oxidation von Ameisensäure zu Kohlenstoffdioxid unter Reduktion von
 Nicotinamadenindinucleotid (NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$). Im Enzymassay wird die
 zeitliche NADH-Zunahme bei 25 °C photometrisch bei einer Wellenlänge von
 340 nm detektiert.

20 Zusammensetzung des Enzymassay: 1 ml Puffer-Lösung (50 mM
 Triethanolamin- Hydrochlorid, 1 mM Dithiothreitol, Salzsäure) pH 7 wird mit
 0,1 ml wässriger Natriumformiat-Lösung (2,4 M) und 0,1 ml Enzym-Lösung
 (0,7 mg/ml, 8,4 U) versetzt. Die Enzym-Lösung enthält bereits den Cofaktor
 NAD (6 mM).

25

Um den Einfluss wasserlöslicher ionischer Flüssigkeiten auf die Enzymaktivität
 zu testen, wird das Volumen der Puffer-Lösung im Assay schrittweise um 25
 vol% reduziert und durch die ionische Flüssigkeit ersetzt.

Ionische Flüssigkeit	25 vol%	50 vol%	75 vol%
MMIm ⁺ MeSO_4^-	±	+	+

Tabelle 1 NAD-Reduktion durch Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*; Enzymaktivität im Vergleich zur Standardreaktion in Pufferlösung (+) gut bis besser, (\pm) gleich.

5

2. β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* zur Synthese von *N*-Acetylglucosamin

Es wird der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den Verlauf der β -Gal-
10 katalysierten Transgalactosylierung ausgehend von Lactose und *N*-Acetylglucosamin untersucht. Hierzu werden Konzentrations-Zeit-Verläufe dieser Synthese in Gegenwart und Abwesenheit ionischer Flüssigkeiten aufgenommen und verglichen.

15 Je Versuchsreihe werden in 1 ml GC-Gläschen 10 Reaktionen parallel angesetzt. Im 10-Minuten-Intervall werden die Reaktionen durch 10 minütiges Kochen bei 100 °C gestoppt, die Reaktionslösung filtriert (Spritzenfilter Minisart RC 4 Sartorius) und die Konzentration der Reaktionskomponenten zu diesem Zeitpunkt chromatographisch bestimmt (Kationentauschersäule
20 Aminex HPX-87H der Firma BioRad mit entsprechender Vorsäule, 0,006 M Schwefelsäure als Eluent mit einem Fluss von 0,8 ml/min und einer Säulentemperatur von 65 °C. Die Detektion erfolgt mittels UV bei 208 nm und mittels Brechungsindex).

25 Zusammensetzung der Reaktionsmischung: 0,05 ml Puffer-Lösung (65 mM KH_2PO_4 , 195 mM K_2HPO_4) pH 7,3 werden mit 0,5 ml *N*-Acetylglucosamin-Lösung (GlcNAc 600 mM bzw. 1,2 M in Puffer-Lösung), 0,25 ml Lactose-Lösung (250 mM in Puffer-Lösung) und 0,2 ml Enzym-Lösung (10 mg/ml in Puffer-Lösung) versetzt.

30

Durch Austausch von Puffer-Lösung gegen ionische Flüssigkeit in den Substrat-Lösungen wird der Anteil an ionischer Flüssigkeit im

Reaktionsmedium schrittweise erhöht. Damit ergeben sich folgende Substratlösungen:

- 5 a) 0,50 ml *N*-Acetylglucosamin-Lösung (600 mM in 1:4 MMIm⁺ MeSO₄⁻ :
Puffer-Lösung)
- b) 0,50 ml *N*-Acetylglucosamin-Lösung (600 mM in 1:4 MMIm⁺ MeSO₄⁻ :
Puffer-Lösung)
0,25 mL Lactose-Lösung (250 mM in 1:4 MMIm⁺ MeSO₄⁻ : Puffer-Lösung)
- 10 c) 0,50 ml *N*-Acetylglucosamin-Lösung (1,2 M in 1:2 MMIm⁺ MeSO₄⁻ : Puffer-
Lösung)
0,25 mL Lactose-Lösung (250 mM in 1:2 MMIm⁺ MeSO₄⁻ : Puffer-Lösung)
- d) 0,50 ml *N*-Acetylglucosamin-Lösung (600 mM in 1:4 BIm⁺ H₂PO₄⁻/Cl⁻ :
Puffer-Lsg.)

Reaktions- medium	Anteil [vol%]	Lactose/ GlcNAc Verhältnis	Ausbeute [%] nach 60 min	Ausbeute [%] nach 100 min
Phosphat-Puffer		1 : 2,4	5	3
MMIm ⁺ MeSO ₄ ⁻	a) 12,5	1 : 2,4	40	40
	b) 18,75	1 : 2,4	44	43
	c) 25	1 : 4,8	49	55 (90 min)
BIm ⁺ H ₂ PO ₄ ⁻ /Cl ⁻	d) 12,5	1 : 2,4	39	30

15

Tabelle 2 Synthese von *N*-Acetyllactosamin durch β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* mit und ohne ionische Flüssigkeit

20 **3. Enantioselektive Acylierung von *R,S*-1-Phenylethanol durch
Katalyse mit Lipase aus *Candida antarctica* (Type B) in ionischen
Flüssigkeiten**

4,4 ml einer ionischen Flüssigkeit entsprechend Tabelle 3 oder *tert*-
Butylmethylether werden mit 122 μ l Vinylacetat und 54 μ l 1-Phenylethanol
25 versetzt, sodass eine Substratlösung mit etwa 0,1 mol/l 1-Phenylethanol und

0,3 mol/l Vinylacetat erhalten wird. Je 1 mg lyophilisierte Lipase (>120 U/mg) wird mit 0,4 ml Substratlösung versetzt, gründlich gemischt und im Thermoschüttler bei 24 °C unter leichtem Schütteln 3-4 d inkubiert.

Zur Aufarbeitung werden 100 µl des Reaktionsansatzes mit 1 ml n-Hexan/Isopropanol (97,5/2,5 v/v) versetzt und gründlich gemischt. Dieser Hexan/Isopropanol-Extrakt wird zur Bestimmung der Konzentrationen und Enantiomerenverhältnisse von 1-Phenylethanol und 1-Phenylethylacetat mittels HPLC eingesetzt. Aus diesen Konzentrationen wurden der Umsatz und der Enantiomerenüberschuss berechnet (siehe Tabelle 3).

10

HPLC-Bedingungen:

Säule: Schutzsäule Nucleosil C-18 5 µm; 10 mm, 4,6 mm ID;
Vorsäule Chiracel OJ; 50 mm, 4,6 mm ID;
Trennsäule Chiracel OJ; 250 mm, 4,6 mm ID

15 Eluent: isokratisch;
96,5 % (v/v) n-Hexan,
3,0 % (v/v) Isopropanol,
0,5 % (v/v) Ethanol

Flussrate: 1 ml/min

20 Temperatur: 38 °C

Detektion: UV-Detektor (205 nm)

Ionische Flüssigkeit/ Lösungsmittel	Umsatz	Enantiomerenüberschuss
NMIm ⁺ PF ₆ ⁻	±	+
BMIm ⁺ BF ₄ ⁻	+	+
HMIm ⁺ BF ₄ ⁻	±	+
OMIm ⁺ BF ₄ ⁻	+	+
4-MBP ⁺ BF ₄ ⁻	+	+
BMIm ⁺ CF ₃ SO ₃ ⁻	+	+
BMIm ⁺ (CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻	+	+

Tabelle 3 Enantioselektive Acylierung von 1-Phenylethanol, katalysiert durch Lipase aus *Candida antarctica* (Type B): Umsatz und Enantiomerenüberschuss in ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zur Standardreaktion in *tert.*-Butylmethylether; (+) gut bis besser, (±) gleich, (-) schlecht bis kein.

4. Enantioselektive Acylierung von *R,S*-1-Phenylethanol durch Katalyse mit Lipase aus *Candida antarctica* (Type A) in ionischen Flüssigkeiten

Je 5 mg lyophilisierte Lipase (>30 U/mg) werden mit 0,4 ml einer Substratlösung wie in Beispiel 3 vermischt. Die weitere Arbeitsweise entspricht der in Beispiel 3 beschriebenen.

Ionische Flüssigkeit/ Lösungsmittel	Umsatz	Enantiomerenüberschuss
BMIm ⁺ PF ₆ ⁻	+	+
NMIm ⁺ PF ₆ ⁻	+	+
BMIm ⁺ BF ₄ ⁻	±	+
HMIm ⁺ BF ₄ ⁻	+	+
OMIm ⁺ BF ₄ ⁻	+	±
BMIm ⁺ CF ₃ SO ₃ ⁻	+	+

Tabelle 4 Enantioselektive Acylierung von 1-Phenylethanol, katalysiert durch Lipase aus *Candida antarctica* (Type A): Umsatz und Enantiomerenüberschuss in ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zur Standardreaktion in *tert.*-Butylmethylether; (+) gut bis besser, (±) gleich, (-) schlecht bis kein.

5. Enantioselektive Acylierung von *R,S*-1-Phenylethanol durch Katalyse mit Lipase aus *Pseudomonas sp.* in ionischen Flüssigkeiten

Je 3 mg lyophilisierte Lipase (400 U/mg) werden mit 0,4 ml einer Substratlösung wie in Beispiel 3 vermischt. Die weitere Arbeitsweise entspricht der in Beispiel 3 beschriebenen.

5

Ionische Flüssigkeit/ Lösungsmittel	Umsatz	Enantiomeren- überschuss
MIm ⁺ PF ₆ ⁻	±	+
4-MBP ⁺ BF ₄ ⁻	±	+
BMIm ⁺ CF ₃ SO ₃ ⁻	+	+
BMIm ⁺ (CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻	+	+

Tabelle 5 Enantioselektive Acylierung von 1-Phenylethanol, katalysiert durch Lipase aus *Pseudomonas sp.*: Umsatz und Enantiomerenüberschuss in ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zur Standardreaktion in *tert.*-Butylmethylether; (+) gut bis besser, (±) gleich, (-) schlecht bis kein.

10

6. Enantioselektive Acylierung von R,S-1-Phenylethanol durch Katalyse mit Lipase aus *Alcaligines sp.* in ionischen Flüssigkeiten

15

Je 5 mg lyophilisierte Lipase (>20 U/mg) werden mit 0,4 ml einer Substratlösung wie in Beispiel 3 vermischt. Die weitere Arbeitsweise entspricht der in Beispiel 3 beschriebenen.

Ionische Flüssigkeit/ Lösungsmittel	Umsatz	Enantiomeren- überschuss
BMIm ⁺ PF ₆ ⁻	±	+
BMIm ⁺ BF ₄ ⁻	±	+
HMIm ⁺ BF ₄ ⁻	±	+
OMIm ⁺ BF ₄ ⁻	±	+

4-MBP ⁺ BF ₄ ⁻	±	+
BMI ⁺ CF ₃ SO ₃ ⁻	±	+

Tabelle 6 Enantioselektive Acylierung von 1-Phenylethanol, katalysiert durch Lipase aus *Alcaligines sp.*: Umsatz und Enantiomerenüberschuss in ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zur Standardreaktion in *tert.*-Butylmethylether; (+) gut bis besser, (±) gleich, (-) schlecht bis kein.

7. Recycling der Lipase aus *Candida antarctica* (Type B) in ionischer Flüssigkeit durch Destillation

10

600 mg lyophilisierte Lipase (ca. 10 U/mg) werden mit 4 ml ionischer Flüssigkeit (BMI⁺ (CF₃SO₂)₂N⁻), 1,2 ml Vinylacetat und 0,7 ml 1-Phenylethanol versetzt und gründlich gemischt. Die Reaktionsmischung wird 40 min bei 40 °C inkubiert.

15 Anschließend werden die nicht umgesetzten Edukte sowie das Reaktionsprodukt 1-Phenylacetat abdestilliert (85 °C, 0,06 mbar).

Die Enzym/ionische Flüssigkeit-Mischung wird abgekühlt, erneut mit 1,2 ml Vinylacetat und 0,7 ml 1-Phenylethanol versetzt und wiederum 40 min bei 40 °C inkubiert.

20

Diese Reaktionsfolge von Inkubation und Abdestillieren kann mehrfach wiederholt werden, ohne dass die Aktivität der Lipase zurückgeht.

8. Synthese von Lactose durch Revershydrolyse mit β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*

25

100 mmol/l Glucose, 20 mmol/l Galactose und 2 mg/ml Galactosidase werden bei 35 °C im Gemisch aus Wasser und MMIm MeSO₄ für 24 h inkubiert. Die Reaktion wird durch 10 minütiges Kochen bei 100 °C gestoppt, die Reaktionslösung filtriert (Spritzenfilter Minisart RC 4 Sartorius) und die Konzentration der Reaktionskomponenten zu diesem Zeitpunkt chromatographisch bestimmt (Kationentauschersäule Aminex HPX-87H der

30

Firma BioRad mit entsprechender Vorsäule, 0,006 M Schwefelsäure als Eluent mit einem Fluss von 0,8 ml/min und einer Säulentemperatur von 65 °C. Die Detektion erfolgt mittels UV bei 208 nm und mittels Brechungsindex).

Der Anteil der ionischen Flüssigkeit wird von 0 bis 100 Volumenprozent erhöht.

- 5 Durch Wasserspuren in der ionischen Flüssigkeit und den Edukten ergibt sich ein Wassergehalt bei 100% ionischer Flüssigkeit von 0,6%. Nach 24 Stunden steigt der Umsatz nicht mehr weiter an. In Abhängigkeit von der Menge an ionischer Flüssigkeit werden folgende Lactoseausbeuten erhalten:

Anteil ionischer Flüssigkeit in %	Ausbeute [%]
0	0
10	0
20	0
30	4
40	12
50	15
60	15
70	16
80	16
90	16
100	17

Ansprüche:

1. Verfahren zur Umsetzung von Substanzen in Gegenwart von Enzymen als Katalysator in einem Reaktionsmedium umfassend wenigstens eine ionische Flüssigkeit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ionische Flüssigkeit die allgemeine Formel



aufweist wobei

$n = 1$ oder 2 ist und

das Anion $[Y]^{n-}$ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

Tetrafluoroborat ($[BF_4]^-$), Tetrachloroborat ($[BCl_4]^-$), Hexafluorophosphat ($[PF_6]^-$), Hexafluoroantimonat ($[SbF_6]^-$), Hexafluoroarsenat ($[AsF_6]^-$), Tetrachloroaluminat ($[AlCl_4]^-$), Trichlorozinkat ($[ZnCl_3]^-$), Dichlorocuprat, Sulfat ($[SO_4]^{2-}$), Carbonat ($[CO_3]^{2-}$), Fluorosulfonat, $[R'-COO]^-$, $[R'-SO_3]^-$ oder $[(R'-SO_2)_2N]^-$, und R' ein linearer oder verzweigter 1 bis 12 Kohlenstoffatome enthaltender aliphatischer oder alicyclischer Alkyl- oder ein C_5 - C_{18} -Aryl-, C_5 - C_{18} -Aryl- C_1 - C_6 -alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkyl- C_5 - C_{18} -aryl-Rest ist, der durch Halogenatome substituiert sein kann,

das Kation $[A]^+$ ist ausgewählt aus

- quarternären Ammonium-Kationen der allgemeinen Formel



- Phosphonium-Kationen der allgemeinen Formel

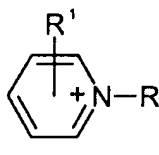


- Imidazolium-Kationen der allgemeinen Formel



wobei der Imidazol-Kern substituiert sein kann mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

- Pyridinium-Kationen der allgemeinen Formel

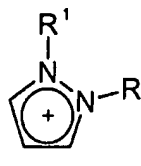


10

wobei der Pyridin-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

- Pyrazolium-Kationen der allgemeinen Formel

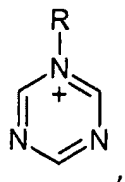
15



20

wobei der Pyrazol-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

- und Triazolium-Kationen der allgemeinen Formel



- wobei der Triazol-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen, und die Reste R¹, R², R³ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der
- 5 Gruppe bestehend aus
- Wasserstoff;
 - linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Alkylgruppen mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen;
 - Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₆-Alkylgruppen mit 3 bis 8
- 10 Kohlenstoffatomen im Heteroaryl-Rest und wenigstens einem Heteroatom ausgewählt aus N, O und S, der mit wenigstens einer Gruppe ausgewählt aus C₁-C₆-Alkylgruppen und/oder Halogenatomen substituiert sein können;
- Aryl-, Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im
- 15 Arylrest, die gegebenenfalls mit wenigstens einer C₁-C₆-Alkylgruppen und/oder einem Halogenatomen substituiert sein können.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der ionischen Flüssigkeit im
- 20 Reaktionsmedium 0,1 bis 99,9 Volumenprozent beträgt.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium zusätzlich zur der ionischen Flüssigkeit noch ein weiteres Lösungsmittel erhält.
- 25
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere Lösungsmittel Wasser oder ein organisches Lösungsmittel ist.
- 30 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Enzyme der EC-Klassen 1 bis 6 eingesetzt werden.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme ausgewählt sind aus der Klasse der Oxidoreduktasen, der Hydrolasen und der Lyasen.
- 5 8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei Temperaturen von -10 °C bis 130 °C durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch
10 gekennzeichnet, dass die Reaktion in einphasiger Weise oder in einem mehrphasigen Reaktionssystem durchgeführt wird.
10. Zusammensetzung umfassend ein Enzym und wenigstens eine ionische Flüssigkeit.
- 15 11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die ionische Flüssigkeit wie in Anspruch 2 definiert ist.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet,
20 dass sie zusätzlich ein Substrat enthält.
13. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie die ionische Flüssigkeit als Reaktionsmedium oder als Bestandteil des Reaktionsmediums enthält.
- 25 14. Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Reaktionsmedium oder als Bestandteil des Reaktionsmediums für enzymatisch katalysierte Reaktionen.
- 30 15. Verwendung gemäß Anspruch 14 als Reaktionsmedium oder als Bestandteil des Reaktionsmediums bei der Revershydrolyse zur Synthese von Di- und Oligosacchariden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/12869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P1/00 C12N9/00 C12P19/04 C12P19/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; Database accession no. 1999:144145, ALSTON, WILLIAM C., II ET AL: "Enzymic reactions in ionic liquids" retrieved from STN XP002163388 abstract & BOOK OF ABSTRACTS, 217TH ACS NATIONAL MEETING, ANAHEIM, CALIF., MARCH 21-25 (1999), BIOT-131 PUBLISHER: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C.,</p> <p>--- -/--</p>	1-15



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 2002

Date of mailing of the international search report

22/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/12869

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; CULL, S. G. ET AL: "Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations" retrieved from STN Database accession no. 133:163060 XP002163389 abstract & BIOTECHNOL. BIOENG. (2000), 69(2), 227-233,</p>	1-15
X	<p>--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ERBELDINGER, MARKUS ET AL: "Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents" retrieved from STN Database accession no. 133:321046 XP002163390 abstract & BIOTECHNOL. PROG. (2000), 16(6), 1131-1133,</p>	1-15
X	<p>--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LAU, R. MADEIRA ET AL: "Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids" retrieved from STN Database accession no. 134:147417 XP002163391 abstract & ORG. LETT. (2000), 2(26), 4189-4191,</p> <p>--- -/--</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP 01/12869

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2000 (2000-11) ERBELDINGER MARKUS ET AL: "Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid: An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents." Database accession no. PREV200100074842 XP002163392 abstract & BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 16, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 1129-1131, ISSN: 8756-7938</p> <p>----</p>	1-15
X	<p>EP 0 226 563 A (SVENSKA SOCKERFABRIKS AB) 24 June 1987 (1987-06-24) siehe insbesondere Ex. 1-3 und S. 5-6 the whole document</p> <p>----</p>	1,3-10, 14,15
Y	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 12, 3 January 2001 (2001-01-03) & JP 2000 245496 A (MEIJI MILK PROD CO LTD), 12 September 2000 (2000-09-12) abstract</p> <p>----</p>	15
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199249 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1992-405174 XP002189948 & KR 9 108 732 B (KOREA ADV INST SCI & TECHN), 19 October 1991 (1991-10-19) abstract</p> <p>-----</p>	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 01/12869

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0226563	A	24-06-1987	SE 451849 B	02-11-1987
			CA 1339112 A1	29-07-1997
			DK 589386 A	12-06-1987
			EP 0226563 A1	24-06-1987
			JP 2716117 B2	18-02-1998
			JP 62240695 A	21-10-1987
			NO 864956 A	12-06-1987
			SE 8505842 A	12-06-1987
			US 4918009 A	17-04-1990
<hr/>				
JP 2000245496	A	12-09-2000	NONE	
<hr/>				
KR 9108732	B	19-10-1991	KR 9108732 B1	19-10-1991
<hr/>				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12P1/00 C12N9/00 C12P19/04 C12P19/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; Database accession no. 1999:144145, ALSTON, WILLIAM C., II ET AL: "Enzymic reactions in ionic liquids" retrieved from STN XP002163388 Zusammenfassung & BOOK OF ABSTRACTS, 217TH ACS NATIONAL MEETING, ANAHEIM, CALIF., MARCH 21-25 (1999), BIOT-131 PUBLISHER: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C., --- -/--	1-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

8 Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Februar 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/02/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; CULL, S. G. ET AL: "Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations" retrieved from STN Database accession no. 133:163060 XP002163389 Zusammenfassung & BIOTECHNOL. BIOENG. (2000), 69(2), 227-233,</p>	1-15
X	<p>--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ERBELDINGER, MARKUS ET AL: "Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents" retrieved from STN Database accession no. 133:321046 XP002163390 Zusammenfassung & BIOTECHNOL. PROG. (2000), 16(6), 1131-1133,</p>	1-15
X	<p>--- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LAU, R. MADEIRA ET AL: "Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids" retrieved from STN Database accession no. 134:147417 XP002163391 Zusammenfassung & ORG. LETT. (2000), 2(26), 4189-4191,</p> <p>--- -/--</p>	1-15

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2000 (2000-11) ERBELDINGER MARKUS ET AL: "Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid: An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents." Database accession no. PREV200100074842 XP002163392 Zusammenfassung & BIOTECHNOLOGY PROGRESS, Bd. 16, Nr. 6, November 2000 (2000-11), Seiten 1129-1131, ISSN: 8756-7938</p> <p>---</p>	1-15
X	<p>EP 0 226 563 A (SVENSKA SOCKERFABRIKS AB) 24. Juni 1987 (1987-06-24) siehe insbesondere Ex. 1-3 und S. 5-6 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,3-10, 14,15
Y	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 12, 3. Januar 2001 (2001-01-03) & JP 2000 245496 A (MEIJI MILK PROD CO LTD), 12. September 2000 (2000-09-12) Zusammenfassung</p> <p>---</p>	15
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199249 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1992-405174 XP002189948 & KR 9 108 732 B (KOREA ADV INST SCI & TECHN), 19. Oktober 1991 (1991-10-19) Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 01/12869

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0226563	A	24-06-1987	SE 451849 B 02-11-1987
			CA 1339112 A1 29-07-1997
			DK 589386 A 12-06-1987
			EP 0226563 A1 24-06-1987
			JP 2716117 B2 18-02-1998
			JP 62240695 A 21-10-1987
			NO 864956 A 12-06-1987
			SE 8505842 A 12-06-1987
			US 4918009 A 17-04-1990
JP 2000245496	A	12-09-2000	KEINE
KR 9108732	B	19-10-1991	KR 9108732 B1 19-10-1991

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Mai 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/038784 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 1/00**,
C12N 9/00, C12P 19/04, 19/12

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12869

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. November 2001 (07.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
00124195.9 8. November 2000 (08.11.2000) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **SOLVENT INNOVATION GMBH** [DE/DE];
Alarichstrasse 14 - 16, 50679 Koeln (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRAGL, Udo**
[DE/DE]; Siebensternweg 17, 18198 Kritzmow (DE).
KAFTZIK, Nicole [DE/DE]; Goethestrasse 6, 18055
Rostock (DE). **SCHÖFER, Sonja** [DE/DE]; Karlstrasse
12, 18055 Rostock (DE). **WASSERSCHIED, Peter**
[DE/DE]; Grevenbroicher Strasse 2, 50829 Koeln (DE).

(74) Anwälte: **WEBER, Thomas** usw.; Patentanwälte, von
Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Koeln
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit geänderten Ansprüchen

Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche:

20. März 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/038784 A1

(54) Title: ENZYME CATALYSIS IN THE PRESENCE OF IONIC LIQUIDS

(54) Bezeichnung: ENZYMKATALYSE IN GEGENWART IONISCHER FLÜSSIGKEITEN

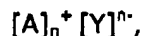
(57) Abstract: The invention relates to the performance of enzyme-catalysed reactions in the presence of ionic liquids.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Durchführung Enzym-katalysierter Reaktionen in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten.

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 19. April 2002 (19.04.2002) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 1-15 durch geänderte Ansprüche 1-13 ersetzt (5 Seiten)]

1. Verfahren zur Umsetzung von Substanzen in Gegenwart von Enzymen als Katalysator in einem Reaktionsmedium umfassend wenigstens eine ionische Flüssigkeit, wobei die Enzyme ausgewählt sind aus der Gruppe der Oxidoreductasen, Lipasen, Galactosidasen, Glycosidasen, Lyasen, und Enzymen der EC-Klasse 6.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ionische Flüssigkeit die allgemeine Formel



aufweist wobei

$n = 1$ oder 2 ist und

das Anion $[Y]^{n-}$ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

Tetrafluoroborat ($[BF_4]^-$), Tetrachloroborat ($[BCl_4]^-$), Hexafluorophosphat ($[PF_6]^-$), Hexafluoroantimonat ($[SbF_6]^-$), Hexafluoroarsenat ($[AsF_6]^-$), Tetrachloroaluminat ($[AlCl_4]^-$), Trichlorozinkat ($[ZnCl_3]^-$), Dichlorocuprat, Sulfat ($[SO_4]^{2-}$), Carbonat ($[CO_3]^{2-}$), Fluorosulfonat, $[R'-COO]^-$, $[R'-SO_3]^-$ oder $[(R'-SO_2)_2N]^-$, und R' ein linearer oder verzweigter 1 bis 12

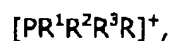
Kohlenstoffatome enthaltender aliphatischer oder alicyclischer Alkyl- oder ein C_5 - C_{18} -Aryl-, C_5 - C_{18} -Aryl- C_1 - C_6 -alkyl- oder C_1 - C_6 -Alkyl- C_5 - C_{18} -aryl-Rest ist, der durch Halogenatome substituiert sein kann,

das Kation $[A]^+$ ist ausgewählt aus

- quarternären Ammonium-Kationen der allgemeinen Formel



- Phosphonium-Kationen der allgemeinen Formel

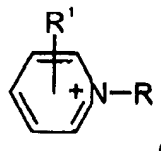


- Imidazolium-Kationen der allgemeinen Formel



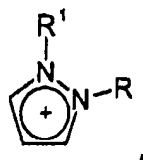
wobei der Imidazol-Kern substituiert sein kann mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

- Pyridinium-Kationen der allgemeinen Formel

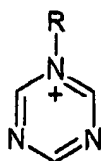


wobei der Pyridin-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,

- Pyrazolium-Kationen der allgemeinen Formel



- wobei der Pyrazol-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen,
- und Triazolium-Kationen der allgemeinen Formel



wobei der Triazol-Kern substituiert sein kann mit mit wenigstens einer Gruppe, die ausgewählt ist aus C₁-C₆-Alkyl-, C₁-C₆-Alkoxy-, C₁-C₆-Aminoalkyl-, C₅-C₁₂-Aryl- oder C₅-C₁₂-Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen, und die Reste R¹, R², R³ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- Wasserstoff;
- linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder alicyclischen Alkylgruppen mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen;
- Heteroaryl-, Heteroaryl-C₁-C₆-Alkylgruppen mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen im Heteroaryl-Rest und wenigstens einem Heteroatom ausgewählt aus N, O und S, der mit wenigstens einer Gruppe ausgewählt aus C₁-C₆-Alkylgruppen und/oder Halogenatomen substituiert sein können;
- Aryl-, Aryl-C₁-C₆-Alkylgruppen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen im Arylrest, die gegebenenfalls mit wenigstens einer C₁-C₆-Alkylgruppen und/oder einem Halogenatomen substituiert sein können.

3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der ionischen Flüssigkeit im Reaktionsmedium 0,1 bis 99,9 Volumenprozent beträgt.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium zusätzlich zur der ionischen Flüssigkeit noch ein weiteres Lösungsmittel erhält.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das weitere Lösungsmittel Wasser oder ein organisches Lösungsmittel ist.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei Temperaturen von -10 °C bis 130 °C durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion in einphasiger Weise oder in einem mehrphasigen Reaktionssystem durchgeführt wird.
8. Zusammensetzung umfassend ein Enzym und wenigstens eine ionische Flüssigkeit.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die ionische Flüssigkeit wie in Anspruch 2 definiert ist.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein Substrat enthält.
11. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie die ionische Flüssigkeit als Reaktionsmedium oder als Bestandteil des Reaktionsmediums enthält.
12. Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Reaktionsmedium oder als Bestandteil des Reaktionsmediums für enzymatisch katalysierte Reaktionen, wobei die Enzyme ausgewählt sind aus der Gruppe der

Oxidoreductasen, Lipasen, Galactosidasen, Glycosidasen, Lyasen, und Enzymen der EC-Klasse 6.

13. Verwendung gemäß Anspruch 12 als Reaktionsmedium oder als Bestandteil des Reaktionsmediums bei der Revershydrolyse zur Synthese von Di- und Oligosacchariden.